

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro**AE**INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation⁶ : G01N 27/00	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/17107 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 8. April 1999 (08.04.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE98/02719 (22) Internationales Anmeldedatum: 14. September 1998 (14.09.98) (30) Prioritätsdaten: 197 42 690.5 26. September 1997 (26.09.97) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): SIEMENS AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Wittelsbacherplatz 2, D-80333 München (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): STANZEL, Manfred [DE/DE]; Binsenstrasse 6, D-91088 Bubenreuth (DE). GUMBRECHT, Walter [DE/DE]; In der Röte 1, D-91074 Herzogenaurach (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: MICRO-STRUCTURED BIO-SENSOR, USE OF SAID BIO-SENSOR AND METHOD FOR IMMOBILISING BIO-CATALYSTS (54) Bezeichnung: MIKROSTRUKTURIERTER BIOSENSOR, VERWENDUNG DES BIOSENSORS UND VERFAHREN ZUR IMMOBILISIERUNG VON BIOKATALYSATOREN (57) Abstract <p>The invention relates to a new bio-sensor, whereby the structure of the gas sensor known from EP 0 588 153 B1 is used for bio-sensory measurements. The special structure of the known sensor enables a two layer enzyme membrane to be formed. Said membrane has a considerably enhanced functionality compared to other known enzyme membranes.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung stellt einen neuen Biosensor vor, bei dem die Struktur des aus der EP 0 588 153 B1 bekannten Gassensors für biosensorische Messungen genutzt wird. Dabei wird mittels der speziellen Struktur dieses bekannten Sensors die Ausbildung einer Zwei-Schicht-Enzymmembran möglich, die gegenüber den bekannten Enzymmembranen eine deutlich gesteigerte Funktionalität hat.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Beschreibung

Mikrostrukturierter Biosensor, Verwendung des Biosensors und Verfahren zur Immobilisierung von Biokatalysatoren

5

Die Erfindung betrifft einen mikrostrukturierten, planaren Biosensor, insbesondere einen Biosensor mit einem Enzym als Biokatalysator. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung des Biosensors sowie ein Verfahren zur Immobilisierung von Biokatalysatoren.

10

Es gibt bereits Analysengeräte mit Erkennungsschichten aus Enzymmembranen oder Enzymschichten (die beiden Begriffe werden hier synonym gebraucht), mittels denen die durch einen enzymatischen Umsatz, beispielsweise von Sauerstoff, verursachte Änderung der Wasserstoffperoxid- oder Sauerstoffkonzentration elektrochemisch oder amperometrisch bestimmbar ist (F. Scheller et. al., „Enzym- und Zellsensoren - Anwendungen, Trends und Perspektiven“, Spektrum der Wissenschaft, September 1992, Seiten 99 bis 103). Die Funktionalität, beispielsweise das Sättigungsverhalten und die Empfindlichkeit, eines solchen Biosensors ist in erster Linie von der Qualität der verwendeten Enzymmembran abhängig. Bei der Herstellung der Membran müssen mehrere Kriterien erfüllt werden (P. Vadgama und P. W. Crump, „Biosensors: Recent Trends“, Analyst, November 1992, Vol. 117, Seiten 1657 bis 1670). Es muß eine möglichst große Menge aktiver Enzyme so immobilisiert oder gebunden werden, daß sie weitgehend funktionsfähig und aktiv bleibt und gleichzeitig in der Membran verhaftet ist. Um diese Bindung der Enzyme in der Membran möglichst schonend zu erreichen, sind eine Reihe von Techniken erarbeitet worden. Es kommen folgende Methoden zum Einsatz: Adsorption, ionische Bindung, Absorption, Einschluß in Mikrokapseln oder in Membranen und kovalente Bindung an Trägersubstanzen.

15

20

25

30

Die Herstellung der Enzymmembranen erfolgt zum einen durch physikalische Bindung der Enzyme in polymeren „Gelen“, wie Poly(hydroxyethylmethacrylat), in denen die Enzyme wie in Netzen gehalten werden. Nachteilig daran ist, daß dabei immer
5 auch Wechselwirkungen zwischen den Gelmolekülen und den Enzymproteinen entstehen, die die Flexibilität der dreidimensionalen Struktur und damit auch die Aktivität der Enzyme nachteilig beeinflussen. Andererseits werden auch Techniken angewandt, mittels denen die Enzymproteine direkt
10 an polymere Träger über kovalente chemische Bindungen angehängt werden. Dabei wird durch Crosslinking, d.h. Vernetzung, zwischen den Aminosäureseitenketten des Enzyms und den aktiven Gruppen des Trägers natürlich erst recht die Dynamik der Tertiärstruktur des Proteins beeinflußt. Diese Struktur ist
15 jedoch eine wichtige Aktivitätsvoraussetzung des Enzyms, weshalb eine solche Einschränkung der Strukturflexibilität mit einer teilweisen Inaktivierung des Enzyms einhergeht.

Aus der EP 0 588 153 B1 ist eine Struktur eines planaren,
20 mikrostrukturierten Gassensorchips mit einer ersten, inneren und einer zweiten, äußeren Begrenzungsstruktur bekannt. Diese Struktur ermöglicht die Ausbildung einer Topf-Deckel-Struktur für eine Meßlösung (Elektrolytlösung) dadurch, daß innerhalb der ersten, inneren Begrenzungsstruktur die Elektrolytlösung
25 (Topf) eingebracht wird, und innerhalb der zweiten, äußeren Begrenzungsstruktur ein hydrophobes und abschirmendes Material (Deckel) so eingebracht wird, daß es die Elektrolytlösung, zusammen mit der ersten, inneren Begrenzungsstruktur, vollständig bedeckt. Mit diesem planaren Sensorchip werden
30 elektrochemisch Gase, wie Sauerstoff und Kohlendioxid, bestimmt.

Für biosensorische Bestimmungen mit einem Sensorchip dieser Art gab es bislang keine Topf-Deckel-Struktur, weil als Erkennungsschicht („Meßlösung“) nur die Enzymmembran, die aus
35

einer einzigen homogenen Schicht gebildet ist, zur Verfügung stand. Die beiden Begrenzungsstrukturen des Chips konnten also bislang für biosensorische Bestimmungen nicht ausgenutzt werden, weil zur Ausbildung der Topf-Deckel-Struktur zwei
5 Schichten anstelle einer einzigen homogenen Schicht vorliegen müssen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, einen Biosensor mit verbesserter Funktionalität zur Verfügung zu stellen, dessen Erkennungsschicht aus zwei Schichten besteht und
10 in der die Dynamik der Tertiärstruktur der Enzyme unverändert bleibt. Weiterhin ist es Aufgabe der Erfindung, Anwendungen für einen solchen Biosensor zu finden. Schließlich ist es Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, mit dem eine Topf-Deckel-Struktur auf einem Sensorchip
15 mit einer inneren und einer äußeren Begrenzungsstruktur herstellbar ist.

Gegenstand der Erfindung ist daher ein mikrostrukturierter, planarer Biosensor, bei dem der biomolekulare Umsatz, der
20 gemessen werden soll, elektrochemisch bestimmbar ist, wobei der Sensor zumindest zwei Begrenzungsstrukturen auf einem planaren Substrat umfaßt:

- eine erste, innere Begrenzungsstruktur, die mit einer
25 Enzymmembran angefüllt ist, und
- eine zweite, äußere Begrenzungsstruktur, die mit einer polymeren Abdeckschicht, die die erste Begrenzungsstruktur mit der Enzymmembran vollständig bedeckt, angefüllt ist.

30 Außerdem ist Gegenstand der Erfindung die Verwendung des Biosensors in der Medizin, nämlich bei der minimal-invasiven Bestimmung von Leitmetaboliten, wie Glucose und Lactat, im Blut.

Schließlich ist Gegenstand der Erfindung ein Verfahren zur Immobilisierung von Biokatalysatoren, bei dem in einem ersten Schritt der Biokatalysator in einer flüssigen Lösung auf ein Substrat in eine erste, innere Begrenzungsstruktur eingefüllt wird, in einem zweiten Schritt dort getrocknet wird und schließlich in einem dritten Schritt mit einer polymerisierbaren Abdeckschicht überzogen wird.

Vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung ergeben sich aus den Unteransprüchen und der Beschreibung.

Bevorzugt wird als Biokatalysator ein Enzym, besonders bevorzugt eines, das als Cosubstrat (Coenzym) Sauerstoff braucht, wie Glucoseoxidase oder Lactatoxidase, eingesetzt.

Bevorzugt enthält die Enzymmembran eine Pufferlösung, die Triethylenglykol und einen Phosphatpuffer umfaßt. Ein Beispiel dafür ist eine Lösung aus 5000 U Glucoseoxidase, 120 µl einer Phosphatpufferlösung (Konzentration 100 mmol/l, pH 7) und 30 µl Triethylenglykol.

Außerdem ist es vorteilhaft, wenn der Enzymmembran eine planarisierende Hilfssubstanz, wie Polyvinylpyrrolidon (PVP), zugesetzt wird.

Vor dem Aufbringen der Abdeckschicht muß die Lösung mit der Enzymmembran oder Enzymschicht so getrocknet sein, daß sie gelartig oder kristallin vorliegt. Die fertig vernetzte Abdeckschicht ist wasserdurchlässig, so daß die Enzymschicht im Betriebszustand des Biosensors wieder feucht sein kann, damit die Enzyme aktiv sind.

Bevorzugt wird als Abdeckschicht eine UV-vernetzende Deckschicht eingesetzt. Ein Beispiel dafür ist ein photostrukturierbares Hydroxyethylmethacrylat-Harz (HEMA-Harz), bestehend

aus einer Lösung von 2,374 g HEMA, 0,025 g Dimethoxyphenylacetophenon (DMAP) und 0,075 g Tetraethylenglykolmethacrylat (TEGM) in 60 µl Triethylenglykol. Es können auch andere polymerisierbare Substanzen eingesetzt werden, solange sie unter Bedingungen härten oder auspolymerisieren, die der Biokatalysator unbeschadet verträgt. Die fertige, d.h. auspolymerisierte Deckschicht muß so beschaffen sein, daß sie für alle an der Reaktion beteiligten Stoffe, außer dem Biokatalysator, durchlässig ist. Beispielsweise muß sie, wenn Glucose bestimmt werden soll, für Wasser, Sauerstoff und Glucose durchlässig sein, nicht aber für das Enzym Glucoseoxidase.

Bevorzugt liegt der Biokatalysator in der Membran möglichst trocken, d.h. entweder kristallin oder gelartig, vor. Als kristallin wird hier eine Enzymmembran bezeichnet, die trocken und planar ist.

Die Begrenzungsstrukturen sind Polymerstrukturen, die beispielsweise aus einem Kunststoff wie Polyimid gebildet sein können. Die Begrenzungsstrukturen können unterschiedlich hoch oder gleich hoch sein.

Die Erfindung ermöglicht eine wesentliche Verbesserung der Funktionalität von Biosensoren, weil sich das Biomolekül ohne störende Wechselwirkung im „Topf“ bewegen kann und wegen des „Deckels“ in der Meßlösung gehalten wird. Dies zeigt sich ganz besonders im verbesserten Sättigungsverhalten (Messungen bis zu einer Glucosekonzentration von ca. 35 mmol/l sind möglich) und in der gesteigerten Sensorempfindlichkeit (Stromdichten von $> 100 \text{ nA} \cdot \text{l}/\text{mmol} \cdot \text{mm}^2$ bei Konzentrationen von $< 20 \text{ mmol/l}$ Glucose) des erfindungsgemäßen Biosensors.

Die erreichte Empfindlichkeit und das Sättigungsverhalten lassen einen Einsatz der Erfindung sowohl im medizinisch-physiologischen Rahmen zu, der zwischen 3 und 20 mmol/l

6

(Konzentration an zu messender Substanz) liegt, als auch in der Biotechnologie, bei der - je nach Anwendungsfall - die Anforderungen bis zu einem Bereich von 100 mmol/l und in Extremfällen auch darüber reichen.

5

Patentansprüche

1. Mikrostrukturiertes, planares Biosensor, bei dem der zu messende biomolekulare Umsatz elektrochemisch bestimmbar ist, wobei der Sensor zumindest zwei Begrenzungsstrukturen auf einem planaren Substrat umfaßt:
 - eine erste, innere Begrenzungsstruktur, die mit einer Enzymmembran angefüllt ist, und
 - eine zweite, äußere Begrenzungsstruktur, die mit einer polymeren Abdeckschicht, die die erste Begrenzungsstruktur mit der Enzymmembran vollständig bedeckt, angefüllt ist.
2. Biosensor nach Anspruch 1, bei dem das Enzym als Co-substrat Sauerstoff benötigt.
3. Biosensor nach Anspruch 1 oder 2, bei dem in der Enzymmembran eine Pufferlösung enthalten ist, die Triethylenglykol und einen Phosphatpuffer umfaßt.
4. Biosensor nach einem der Ansprüche 1 bis 3, bei dem die Abdeckschicht ein UV-vernetzendes Polymer ist.
5. Biosensor nach Anspruch 4, bei dem die Abdeckschicht ein photostrukturierbares Hydroxyethylmethacrylat-Harz ist.
6. Biosensor nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, bei dem das Enzym in der Enzymmembran kristallin vorliegt.
7. Verwendung des Biosensors nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6 zur minimal-invasiven Bestimmung von Glucose oder Lactat im Blut.
8. Verfahren zur Immobilisierung von Biokatalysatoren, bei dem in einem ersten Schritt ein Biokatalysator in einer flüssigen Lösung auf ein Substrat in eine erste, innere

8

Begrenzungsstruktur eingefüllt wird, in einem zweiten Schritt dort getrocknet wird und schließlich in einem dritten Schritt mit einer polymerisierbaren Abdeckschicht überzogen wird.

5

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12Q 1/00, G01N 27/327	A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/17107 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 8. April 1999 (08.04.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE98/02719 (22) Internationales Anmeldedatum: 14. September 1998 (14.09.98) (30) Prioritätsdaten: 197 42 690.5 26. September 1997 (26.09.97) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): SIEMENS AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Wittelsbacherplatz 2, D-80333 München (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): STANZEL, Manfred [DE/DE]; Binsenstrasse 6, D-91088 Bubenreuth (DE). GUMBRECHT, Walter [DE/DE]; In der Röte 1, D-91074 Herzogenaurach (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i> (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 20. Mai 1999 (20.05.99)	
(54) Title: MICRO-STRUCTURED BIO-SENSOR, USE OF SAID BIO-SENSOR AND METHOD FOR IMMOBILISING BIO-CATALYSTS (54) Bezeichnung: MIKROSTRUKTURIERTER BIOSENSOR, VERWENDUNG DES BIOSENSORS UND VERFAHREN ZUR IMMOBILISIERUNG VON BIOKATALYSATOREN (57) Abstract The invention relates to a new bio-sensor, whereby the structure of the gas sensor known from EP 0 588 153 B1 is used for bio-sensory measurements. The special structure of the known sensor enables a two layer enzyme membrane to be formed. Said membrane has a considerably enhanced functionality compared to other known enzyme membranes. (57) Zusammenfassung Die Erfindung stellt einen neuen Biosensor vor, bei dem die Struktur des aus der EP 0 588 153 B1 bekannten Gassensors für biosensorische Messungen genutzt wird. Dabei wird mittels der speziellen Struktur dieses bekannten Sensors die Ausbildung einer Zwei-Schicht-Enzymmembran möglich, die gegenüber den bekannten Enzymmembranen eine deutlich gesteigerte Funktionalität hat.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 98/02719

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12Q1/00 G01N27/327

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GB 2 230 865 A (NAT RES DEV) 31 October 1990 see abstract; claims 1,4,7 ---	1-8
X	EP 0 216 467 A (UNIV CALIFORNIA) 1 April 1987 see column 4, line 12 - column 5, line 21; figure 1 ---	1-3,6-8
X	EP 0 415 124 A (NIPPON ELECTRIC CO) 6 March 1991 see column 2, line 29 - line 47 ---	1,6,8
E	EP 0 872 729 A (AVL MEDICAL INSTR) 21 October 1998 see column 2, line 53; figures 2,3 see column 4, line 28 - line 52 --- -/--	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 March 1999

Date of mailing of the international search report

06/04/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer:

Hart-Davis, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. .onal Application No

PCT/DE 98/02719

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 636 879 A (MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD) 1 February 1995 see figure 4; example 3 ---	1-3, 6-8
A	EP 0 588 153 A (SIEMENS AG) 23 March 1994 cited in the application see figure 1 ---	1, 2
A	P VADGAMA, P W CRUMP: "Biosensors: Recent Trends" ANALYST, vol. 117, November 1992, pages 1657-1670, XP002096648 cited in the application see the whole document ---	1-8
A	F SCHELLER, F SCHUBERT, D PFEIFFER: "Enzym- und Zellsensoren - Anwendungen, Trends und Perspektiven" SPEKTRUM DER WISSENSCHAFT, vol. 9, September 1992, pages 99-103, XP002096649 cited in the application see the whole document -----	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 98/02719

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB 2230865 A	31-10-1990	WO 9013021 A	01-11-1990
EP 0216467 A	01-04-1987	AU 591150 B	30-11-1989
		AU 6038686 A	26-03-1987
		CA 1247700 A	27-12-1988
		JP 2528102 B	28-08-1996
		JP 62073150 A	03-04-1987
		US 4890620 A	02-01-1990
EP 0415124 A	06-03-1991	JP 3065644 A	20-03-1991
		JP 2508297 B	19-06-1996
		JP 3122560 A	24-05-1991
		DE 69023430 D	14-12-1995
		DE 69023430 T	18-07-1996
		US 5196340 A	23-03-1993
EP 0872729 A	21-10-1998	AT 66497 A	15-04-1998
EP 0636879 A	01-02-1995	JP 7083872 A	31-03-1995
		US 5658443 A	19-08-1997
EP 0588153 A	23-03-1994	AT 146882 T	15-01-1997
		DE 59304876 D	06-02-1997
		DK 588153 T	16-06-1997
		FI 933950 A	15-03-1994
		JP 6194336 A	15-07-1994
		US 5376255 A	27-12-1994

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/02719

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12Q1/00 G01N27/327

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	GB 2 230 865 A (NAT RES DEV) 31. Oktober 1990 siehe Zusammenfassung; Ansprüche 1,4,7 ---	1-8
X	EP 0 216 467 A (UNIV CALIFORNIA) 1. April 1987 siehe Spalte 4, Zeile 12 - Spalte 5, Zeile 21; Abbildung 1 ---	1-3,6-8
X	EP 0 415 124 A (NIPPON ELECTRIC CO) 6. März 1991 siehe Spalte 2, Zeile 29 - Zeile 47 ---	1,6,8
E	EP 0 872 729 A (AVL MEDICAL INSTR) 21. Oktober 1998 siehe Spalte 2, Zeile 53; Abbildungen 2,3 siehe Spalte 4, Zeile 28 - Zeile 52 --- -/--	1-8



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

15. März 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

06/04/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hart-Davis, J

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/02719

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
GB 2230865 A	31-10-1990	WO 9013021 A	01-11-1990
EP 0216467 A	01-04-1987	AU 591150 B	30-11-1989
		AU 6038686 A	26-03-1987
		CA 1247700 A	27-12-1988
		JP 2528102 B	28-08-1996
		JP 62073150 A	03-04-1987
		US 4890620 A	02-01-1990
EP 0415124 A	06-03-1991	JP 3065644 A	20-03-1991
		JP 2508297 B	19-06-1996
		JP 3122560 A	24-05-1991
		DE 69023430 D	14-12-1995
		DE 69023430 T	18-07-1996
		US 5196340 A	23-03-1993
EP 0872729 A	21-10-1998	AT 66497 A	15-04-1998
EP 0636879 A	01-02-1995	JP 7083872 A	31-03-1995
		US 5658443 A	19-08-1997
EP 0588153 A	23-03-1994	AT 146882 T	15-01-1997
		DE 59304876 D	06-02-1997
		DK 588153 T	16-06-1997
		FI 933950 A	15-03-1994
		JP 6194336 A	15-07-1994
		US 5376255 A	27-12-1994

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 98/02719

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB 2230865	A	31-10-1990	WO 9013021 A	01-11-1990
EP 0216467	A	01-04-1987	AU 591150 B	30-11-1989
			AU 6038686 A	26-03-1987
			CA 1247700 A	27-12-1988
			JP 2528102 B	28-08-1996
			JP 62073150 A	03-04-1987
			US 4890620 A	02-01-1990
EP 0415124	A	06-03-1991	JP 3065644 A	20-03-1991
			JP 2508297 B	19-06-1996
			JP 3122560 A	24-05-1991
			DE 69023430 D	14-12-1995
			DE 69023430 T	18-07-1996
			US 5196340 A	23-03-1993
EP 0872729	A	21-10-1998	AT 66497 A	15-04-1998
EP 0636879	A	01-02-1995	JP 7083872 A	31-03-1995
			US 5658443 A	19-08-1997
EP 0588153	A	23-03-1994	AT 146882 T	15-01-1997
			DE 59304876 D	06-02-1997
			DK 588153 T	16-06-1997
			FI 933950 A	15-03-1994
			JP 6194336 A	15-07-1994
			US 5376255 A	27-12-1994